

ความผันแปรทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกคโนสพริก
Morphological variation of *Colletotrichum* spp, causal agents of chilli anthracnose

รัตยา พงศ์พิสุทธา¹ วรานันท์ วิญญรัตน์¹ โชติรส รอดเกต¹ และเทพพนม แสงเพลิง¹
Ratiya Pongpisutta¹, Waranun Winyarat¹ Chotirot Rodkate¹ and Teppanom Sangpleung¹

Abstract

Colletotrichum isolates collected from 15 provinces occurring in chilli plantations showed morphological variation of each species. Based on morphological characteristics on potato dextrose agar (PDA), *C. gloeosporioides* showed 9 phenotypes whilst *C. capsici* and *C. acutatum* represented 6 and 5 phenotypes, respectively. Conidia of *C. gloeosporioides* formed in pale peach, pale salmon, salmon, salmon orange, orange and bright orange masses, straight, cylindrical with round end, sometimes found tapered at one end. Characters of *C. capsici* conidia produced in buff, peach, pale peach, salmon, pale salmon and salmon orange masses with falcate to fusiform in shapes. Whilst *C. acutatum* conidia showed with orange and bright orange conidial masses, ellipsoid-fusiform and tapered at one or both ends. However, all isolates also need to be discriminated using molecular technique.

Keywords: *Colletotrichum*, morphological variation, chilli

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Colletotrichum* เก็บรวบรวมจากแปลงพริกใน 15 จังหวัด มีความหลากหลายทางลักษณะสัณฐานวิทยาในแต่ละสปีชีส์ อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) พบว่า *C. gloeosporioides* แบ่งเป็น 9 กลุ่ม ขณะที่ *C. capsici* และ *C. acutatum* แบ่งเป็น 6 และ 5 กลุ่ม ตามลำดับ กลุ่มสปอร์ของ *C. gloeosporioides* สี pale peach, pale salmon, salmon, salmon orange, orange และ bright orange รูปร่างทรงกระบอกตรง ปลายมน อาจพบบ้างที่ปลายด้านหนึ่งเรียว ส่วน *C. capsici* พบการสร้างกลุ่มสปอร์สี buff, peach, pale peach, salmon, pale salmon และ salmon orange สปอร์มีรูปร่างเสี้ยววงพระจันทร์ จนถึงรูปร่างรีตรง ปลายแหลม สำหรับสปอร์ของ *C. acutatum* นั้นสร้างกลุ่มสปอร์สี orange และ bright orange มีรูปร่างรี หรือปลายเรียวด้านใดด้านหนึ่ง อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องศึกษาความแตกต่างโดยอาศัยเทคนิคทางด้านอณูชีวโมเลกุลร่วมกัน

คำสำคัญ: *Colletotrichum*, ความผันแปรทางสัณฐานวิทยา, พริก

คำนำ

โรคแอนแทรกคโนสพริกเกิดจากเชื้อราสาเหตุหลัก 3 สปีชีส์ คือ *C. acutatum*, *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* ในอดีตนั้นเคยมีรายงานว่าพบ *C. acutatum* ในประเทศไทย ส่วน *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* นั้นมีรายงานว่าพบเชื้อสาเหตุมานานแล้ว การสำรวจเชื้อสาเหตุในแปลงเป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้ทราบการเปลี่ยนแปลงในปัจจุบัน เพื่อเป็นข้อมูลนำไปสู่การประเมินความรุนแรงของโรคที่จะเกิดขึ้นได้ เนื่องจากเชื้อรานี้มีความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง ปัญหาที่ตามมาในการจัดจำแนกสปีชีส์ของ *Colletotrichum* โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาจึงเกิดขึ้นได้ งานวิจัยนี้เป็นการสำรวจสปีชีส์ของเชื้อ *Colletotrichum* ในแหล่งปลูกที่สำคัญ และศึกษาความผันแปรทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรกคโนสพริก

¹ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม 73140

¹ Department of Plant Pathology at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140

อุปกรณ์และวิธีการ

การสำรวจเชื้อราสาเหตุจากแห่งปลุกพริก การแยกเชื้อและการจัดจำแนก และการศึกษาความผันแปรทางสัณฐานวิทยา

เก็บตัวอย่างผลพริกที่เป็นโรคแอนแทรคโนสจาก 15 จังหวัดคือ เชียงราย เชียงใหม่ สุโขทัย พิษณุโลก เพชรบูรณ์ นครสวรรค์ อุตรดิตถ์ ขอนแก่น นครราชสีมา ศรีสะเกษ อุบลราชธานี กาญจนบุรี นครปฐม ประจวบคีรีขันธ์ และนครศรีธรรมราช แยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting method บนอาหาร PDA จากนั้นทำ single spore isolation (SSI) เก็บเชื้อราบน potato carrot agar (PCA) slant จากนั้นย้ายเชื้อราลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA จัดจำแนกสปอร์เชื้อโดยอาศัยลักษณะโคโลนี สีของกลุ่มสปอร์ รูปร่างและขนาดของสปอร์ การสร้าง/ไม่สร้าง seta และลักษณะของ appressoria จัดกลุ่มแต่ละสปอร์ โดยอาศัยลักษณะทางโคโลนีเป็นพื้นฐาน

ผล

การสำรวจเชื้อราสาเหตุจากแห่งปลุกพริก การแยกเชื้อและการจัดจำแนก และการศึกษาความผันแปรทางสัณฐานวิทยา

การสำรวจพื้นที่ปลุกพริก 15 จังหวัด พบเชื้อรา *Colletotrichum* จำนวน 389 ไอโซเลท อาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา สามารถจัดจำแนกสปอร์ได้โดยแบ่งเป็น *C. acutatum*, *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* จำนวน 88, 155 และ 146 ไอโซเลท ตามลำดับ พื้นที่ที่พบ *C. capsici* เพียงสปอร์เดียวคือ นครศรีธรรมราช ส่วน *C. gloeosporioides* พบ 100% ในสุโขทัย สำหรับ *C. acutatum* พบมากที่สุด 90% ในจังหวัดเชียงราย พื้นที่ปลุกพริกที่พบทั้ง 3 สปอร์ ได้แก่ เชียงใหม่ พิษณุโลก เพชรบูรณ์ อุบลราชธานี นครราชสีมา นครปฐม และกาญจนบุรี (Table 1) จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า *C. acutatum* สร้างสปอร์เซลล์เดี่ยว รูปร่างตรง หรือ fusiform ปลายเรียวด้านใดด้านหนึ่งหรืออาจพบทั้งสองด้าน อาจพบรอยคอดกลางสปอร์ ขนาดของสปอร์ 2.5-5.0 x 7.5-23.75 µm ไม่พบการสร้าง seta (Figure 2-A) ส่วน *C. capsici* สปอร์มีเซลล์เดี่ยว รูปร่าง falcate จนถึง fusiform ปลายแต่ละด้านเรียว ขนาดของสปอร์ 1.25-3.75 x 7.5-32.5 µm สร้าง seta ได้ดี (Figure 2-B) สำหรับ *C. gloeosporioides* สปอร์ 1 เซลล์ รูปร่าง cylindrical ตรงปลายมน ฐานตัดตรง ขนาดของสปอร์ 2.5-5.0 x 3.75-23.75 µm พบการสร้าง seta หรือไม่สร้างก็ได้ (Figure 2-C)

Table 1 Sources of *Colletotrichum* isolates and percentage of each species was found

Cultivated area	<i>Colletotrichum</i> species (%)			Cultivated area	<i>Colletotrichum</i> species (%)		
	Ca	Cc	Cg		Ca	Cc	Cg
Chiang Rai	90.0	0.0	10.0	Nakhon Ratchasima	50.0	30.6	19.4
Chiang Mai	56.9	23.5	19.6	Si Sa Ket	0.0	63.2	36.8
Sukhothai	0.0	0.0	100.0	Ubon Ratchathani	5.6	66.6	27.8
Phitsanulok	8.3	8.3	83.4	Kanchanaburi	12.3	54.4	33.3
Phetchabun	4.4	39.1	56.5	Nakhon Pathom	31.7	39.0	29.3
Nakhon Sawan	0.0	33.3	66.7	Prachuap Khiri Khan	0.0	66.7	33.3
Udon Thani	0.0	50.0	50.0	Nakhon Si Thammarat	0.0	100.0	0.0
Khon Kaen	0.0	5.9	94.1				

อาศัยลักษณะโคโลนีในการแบ่งกลุ่มพบว่า *C. acutatum* มี 5 กลุ่ม โดยที่ *Ca1* โคโลนีฟูเล็กน้อย เส้นใยสีขาวปนเทา สร้าง concentric ring กลุ่มสปอร์สี bright orange (Figure 1-A) *Ca2* เส้นใยสีส้มฟูเล็กน้อย ขอบโคโลนีสีขาว-เทา concentric ring ไม่ชัดเจน กลุ่มสปอร์สี orange และ bright orange (Figure 1-B) *Ca3* เส้นใยสีเทาขอบขาว ฟูเล็กน้อย กลางโคโลนีสร้างเส้นใยสีเทา-เทาเข้ม concentric ring ไม่ชัดเจน พบกลุ่มสปอร์ใต้โคโลนีสี orange-bright orange (Figure 1-C) *Ca4* เส้นใยสีขาวอมเทา เส้นใยค่อนข้างแน่น สร้างกลุ่มสปอร์น้อยมากพบใต้โคโลนีสี orange จนถึง bright orange (Figure 1-D) และ *Ca5* โคโลนีเจริญบางๆ บนผิวหน้าอาหาร เป็น concentric ring กลุ่มสปอร์สี bright orange (Figure 1-E) ส่วน *C. capsici* แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ซึ่ง *Cc1* โคโลนีเจริญแน่นสีเทา-เทาเข้ม ขอบเทาขาว พบ concentric ring ชัดเจน พบกลุ่มสปอร์เมื่อมีอายุมากกว่า 2 สัปดาห์ สี buff, pale peach, peach, pale salmon, salmon, salmon orange (Figure 1-F) *Cc2* โคโลนีเจริญแน่น สีเทาขอบเทาขาว สร้าง concentric ring ชัดเจน สร้างสปอร์ใต้กลุ่มสปอร์สี pale peach, pale salmon, salmon, salmon orange (Figure 1-G) *Cc3* โคโลนีเจริญแน่น สีเทาขอบเทาขาว พบสร้างกลุ่มสปอร์น้อย มีสี pale salmon, salmon,

salmon orange (Figure 1-H) *Cc4* โคโลนีสีเทาเจริญแน่น กลางโคโลนีสีเทาเข้ม พบลักษณะ concentric ring ส่วนมากไม่พบ กลุ่มสปอร์ หากพบมีสี buff, peach, pale peach, pale salmon, salmon, salmon orange (Figure 1-I) *Cc5* เส้นใยสีเทา

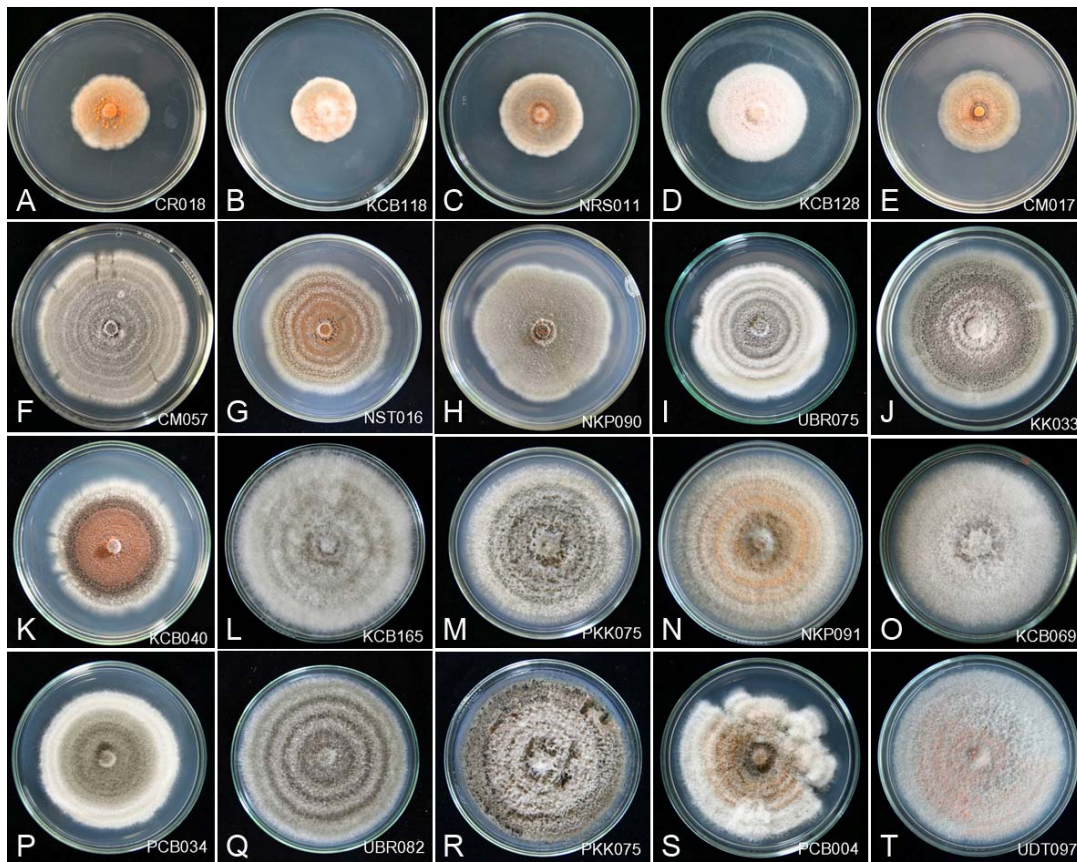


Figure 1 Colony types of *Colletotrichum* species: *Ca1* - *Ca 5* (A-E), *Cc1* - *Cc6* (F-K) and *Cg1* - *Cg9* (L-T)

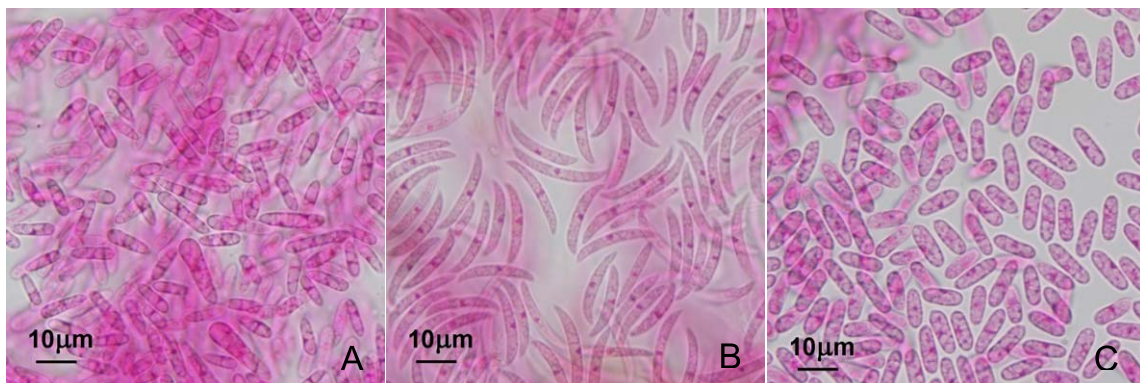


Figure 2 Conidia characteristics of *Colletotrichum* species: *C. acutatum* (A), *C. capsici* (B) และ *C. gloeosporioides* (C)

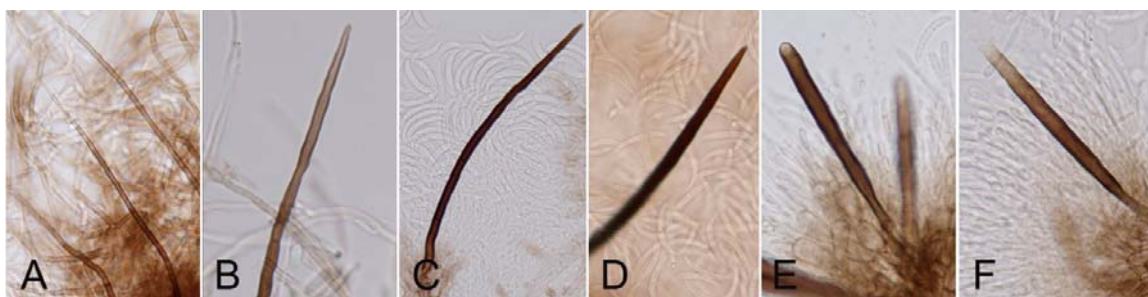


Figure 3 Seta characteristics of *Colletotrichum* species: *C. gloeosporioides* (A-B) and *C. capsici* (C-F)

เจริญแน่น ขอบโคโลนีสีขาว พบ concentric ring กลุ่มสปอร์สี pale peach, pale salmon, salmon, salmon orange (Figure 1-J) และ *Cc6* โคโลนีสีเข้ม กลางโคโลนีสีเทาดำ-ดำ ขอบขาว สร้าง concentric ring กลุ่มสปอร์สี pale peach, pale salmon, salmon, salmon orange (Figure 1-K) ส่วน *C. gloeosporioides* แบ่งออกเป็น 9 กลุ่ม โดย *Cg1* เส้นใยขาวปนเทา กลางโคโลนีสีเขียวเข้มถึงเทา พบกลุ่มสปอร์ค่อนข้างน้อยสี pale salmon-salmon orange/อาจไม่พบ (Figure 1-L) *Cg2* สีขาวเทา เจริญฟูหยาบ บางไอโซเลทกลางโคโลนีมีเส้นใยเขียวมะกอกเทา บางไอโซเลทพบ concentric ring กลุ่มสปอร์สี pale salmon, salmon, orange, bright orange, salmon-orange เมื่ออายุมากกว่า 2 สัปดาห์ (Figure 1-M) *Cg3* โคโลนีขาวปนเทา เรียบกับ ผิวหน้าอาหาร concentric ring ชัดเจน pale peach, pale salmon, salmon, salmon orange, orange (Figure 1-N) *Cg4* โคโลนีสีขาวเจริญแน่นบนผิวหน้าอาหาร ละเอียด บางไอโซเลท พบเส้นใยสีเขียวมะกอก-เทาเข้มกลางโคโลนี ไม่พบกลุ่มสปอร์/หากพบมีสี pale salmon, salmon orange และ bright orange ใต้โคโลนี (Figure 1-O) *Cg5* เส้นใยสีเทา-เทาเข้ม-เขียวมะกอก เจริญแน่นบนอาหาร บางไอโซเลทพบกลางโคโลนีสีเขียวมะกอก-เทา ขอบโคโลนีสีขาว ไม่พบกลุ่มสปอร์/หากพบมีสี pale peach และ pale salmon เมื่ออายุมากกว่า 2 สัปดาห์ (Figure 1-P) *Cg6* โคโลนีเขียวอมเทา/เขียวมะกอก เจริญแน่น พบ concentric ring บางไอโซเลทอาจพบเส้นใยสีขาวฟูเล็กน้อยที่ผิวหน้าอาหาร ไม่พบกลุ่มสปอร์ (Figure 1-Q) *CgZ* เส้นใยสีเขียวมะกอกเจริญแน่น กลางโคโลนีสีขาว-ขาวปนเทา มีลักษณะกลวง ไม่พบกลุ่มสปอร์ (Figure 1-R) *Cg8* เส้นใยสีขาวเจริญฟูบนอาหาร ขอบโคโลนีหยัก บางไอโซเลท สร้างกลุ่มสปอร์มีสี pale salmon เมื่ออายุมากกว่า 2 สัปดาห์ (Figure 1-S) และ *Cg9* เส้นใยสีขาว/ขาวปนเทา/เขียวมะกอก เจริญเรียบ กลุ่มสปอร์เห็นได้ชัดเจน สี salmon pale salmon (Figure 1-T)

วิจารณ์และสรุป

เชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสที่พบในแต่ละพื้นที่ปลูกนั้นได้มีการเปลี่ยนแปลงไป เช่น นครปฐม และกาญจนบุรี เดิมไม่เคยพบ *C. acutatum* มาก่อน การสำรวจปี พ.ศ. 2551 กลับพบสปอร์สีนี้แล้ว คิดเป็น 31.7 และ 12.3 % ตามลำดับ (Table 1) ส่วน *C. gloeosporioides* มีความหลากหลายของลักษณะโคโลนีพบได้มากที่สุดถึง 9 กลุ่ม มีรายงานว่าสปอร์สีนี้มีลักษณะโคโลนีหลายแบบ (Bailey and Jeger, 1992) รองลงมาคือ *C. capsici* พบ 6 กลุ่ม ขณะที่ Sharma *et al.* (2005) ศึกษา *C. capsici* จำนวน 37 ไอโซเลท และจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาและโคโลนีได้ 5 กลุ่ม ส่วน *C. acutatum* แบ่งได้ 5 กลุ่ม รูปร่างสปอร์คล้ายกับ *C. gloeosporioides* มาก แต่ที่พบในพริกนั้นส่วนใหญ่สปอร์ปลายเรียวด้านเดียว ส่วนขนาดสปอร์นั้น Sutton (1980) รายงานว่า *C. acutatum* มีขนาด 2.5-4x8.5-16.5 μm ไอโซเลทที่พบบนนั้นผันแปรมากโดยเฉพาะความยาว ส่วน *C. capsici* มีขนาด 3.5-4x18-23 μm ต่างจากไอโซเลทที่ศึกษาอยู่ค่อนข้างมาก และ *C. gloeosporioides* ขนาด 3-4.5x9-24 μm ซึ่งสัดส่วนความยาวของสปอร์ค่อนข้างแตกต่างกับ *C. gloeosporioides* ที่พบในพริก หากใช้ลักษณะการสร้าง appressorium อาจมีรูปร่างไม่แตกต่างกันนัก พบว่าทั้ง 3 สปอร์สร้าง appressorium สีนน้ำตาลอ่อน-เข้ม พบทั้งที่เจริญเดี่ยวๆ และต่อกันเป็นลูกโซ่ สำหรับ *C. acutatum* รูปร่างแบบ lobe, clavate, long clavate, และ circular ส่วน *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* สร้างรูปร่าง lobe, clavate, long clavate, circular และ cylindrical สำหรับ *C. acutatum* ไม่สร้าง seta ส่วน *C. capsici* สร้าง seta สีนน้ำตาลไปจนถึงน้ำตาลเข้ม มีลักษณะเรียวยาวปลายมน (Fig.3-C) เรียวยาวปลายแหลม (Fig. 3-D) ทรงกระบอก โคนแคบปลายมน (Fig.3-E) และปลายตัด (Fig.3-F) แตกต่างจาก *C. gloeosporioides* ซึ่งพบว่า seta สีนน้ำตาล แคบ ปลายแหลม (Fig.3-A) เรียวแหลมปลายมนเล็กน้อย (Fig.3-B) งานวิจัยครั้งนี้พบว่า *Colletotrichum* แต่ละสปอร์สีมีความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาและลักษณะโคโลนี ข้อมูลวิจัยครั้งนี้ควรมองความสำคัญของ race หรือ pathotype ที่เกิดขึ้นในแต่ละพื้นที่ที่ปลูกพริก นำไปสู่การประเมินความรุนแรงของโรคที่จะเกิดขึ้นและการวางแผนการควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่สนับสนุนทุนสำหรับงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Bailey, J.A. and Jeger, M.J. 1992. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International, Wallingford, UK.: 388 p.
- Sharma, P.N., Kaur, M., Sharma, O.P., Sharma, P. and Pathania, A. 2005. Morphological, pathological and molecular variability in *Colletotrichum capsici* the cause of fruit rot of chillies in the subtropical region of north-western India. *J. Phytopathology* 153, 232-237.
- Sutton, B.C. 1980. *The Coelomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England: 696 p..